基础研究 文章编号:0253-3626(2010)11-1665-03

MNU 诱导大鼠膀胱癌的机制研究

陈 刚[1],张 尧[1],敖 鹏[1],罗春丽[2],吴小候[1]

(1. 重庆医科大学附属第一医院泌尿科;2. 重庆医科大学检验系国家重点实验室;重庆 400016)

【摘 要】目的:研究 N-甲基-N-亚硝基脲(N-methyl-N-nitrosourea,MNU)诱导膀胱癌发生的机制。方法:60 只 SD 大鼠随机分成实验组和对照组。实验组用 MNU 2 mg/次,2 周 1 次定期作膀胱内灌注,共 4 次。对照组膀胱内灌以生理盐水 0.2 ml/次,每 2 周 1 次,共 4 次。第 9 周未处死大鼠,随即取大鼠膀胱放入 -80℃液氮中保存。采用免疫组化检测 H-Ras 蛋白的表达,RT-PCR 检测磷脂酶 C ε(PLC ε)mRNA 的表达。结果:实验组 50 只 SD 大鼠 36 只成瘤,4 只大鼠死亡,成瘤率为 81.82%。对照组 10 只大鼠膀胱未见明显变化。免疫组化检测实验组 36 只成瘤大鼠中 32 只 H-Ras 蛋白阳性。对照组大鼠膀胱组织中 H-Ras 蛋白表达阴性。RT-PCR,检测实验组和对照组大鼠膀胱 PLC ε 的表达。实验组 36 只成瘤大鼠 PLC ε 阳性,对照组 PLC ε 表达阴性。结论:MNU 可诱导大鼠膀胱黏膜发生癌变,其可能机制为引起 H-Ras 基因突变并且过表达,同时引起 PLC ε mRNA 表达增加。

【关键词】N-甲基-N-亚硝基脲;膀胱癌;机制;H-Ras;PLC ε

【中国图书分类法分类号】R737.14 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-06-25

The mechanism of MNU derived rat bladder cancer

CHEN Gang, et al

(*Department of Urology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the mechanism of N-methyl-N-nitrosourea (MNU) derived bladder cancer. *Methods*: 60 SD Rats were devided into experimental group and control group at random. NMU was used to intravesical perfuse per 2 weeks at the dose of 2 mg for 8 w in experimental group, while saline was used

作者介绍:陈 刚(1985-),男,硕士,
研究方向:泌尿系肿瘤的治疗。

通讯作者:吴小候,男,教授,E-mail:wuxiaohou80@hotmail.com。

型转化的影响,结果证实在 LPS 诱导后 BEC 表达了间叶细胞标志物,即发生了 EMT。

新的研究还发现上皮细胞发生 EMT 后有几个不同转归:维持 MFB 表型;维持成纤维细胞表型;凋亡;逆转,即重新转分化为正常上皮细胞[8,9]。可逆性是 EMT 的一个重要特征,在适宜的微环境条件下,经 EMT 所形成的间质细胞又可重新转化为具有正常形态和功能的上皮细胞,这一现象又称间质-上皮转化(Mesenchymal-epithelial transition,MET)[10]。即肝内胆管及其组成成分肝内胆管上皮细胞损伤消失后,经恰当治疗,部分胆管消失区又可重现具有正常结构和功能的肝内胆管。因此 EMT 可逆性及发生 EMT 的细胞存在凋亡现象的发现为纤维化相关疾病的治疗带来了新的希望,如果以 EMT 逆转以及以发生 EMT 的细胞凋亡为分子靶点进行干预,可能是提高治疗效果的有效策略。

参 考 文 献

[1] Strutz F, Okada H, Neilson E G. The role of the tubular epithelial cell in renal fibrogenesis[J]. Clin Exp Nephrol, 2001, 5(3): 62-74.

[2] Savager P. Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition[J]. Bioessays, 2001, 23(2): 912-923.

[3] Rygiel K A, Robertson H, Marshall H L, et al. Epithelial-mesenchymal transition contributes to portal tract fibrogenesis during human chronic liver disease[J]. Laboratory Investigation, 2008, 88(2): 112-123.

[4] 陈丽萍,郭毅武.STAT3 活化在脂多糖刺激大鼠胆管上皮细胞增殖中的作用[J].中国病理生理杂志,2007,23(5):921-925.

[5] 苏钢强,徐志海,邹移海.实验动物学[M].科学出版社,2007.55-79.

[6] Shi Y Y, Nacamuli R P, Salim A, et al. The osteogenic potential of adipose-derived mesenchymal cells is maintained with aging[J]. Plast Reconstr Surg, 2005, 116(16): 1686-1696.

[7] Thiery J P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. Nat Rev Cancer, 2002, 2: 442-454.

[8] Hugo H, Ackland M L, Blick T, et al. Epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions in carcinoma progression[J]. J Cell Physiol, 2007, 213(2): 374-383.

[9] Rubio D, Garcia S, De la Cueva T, et al. Human mesenchymal stem cell transformation is associated with a mesenchymal-epithelial transition [J]. Exp Cell Res, 2008, 314(4): 691-698.

[10] Vincan E, Brabletz T, Faux M C, et al. A human three-dimensional cell line model allows the study of dynamic and reversible epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transition that underpins colorectal carcinogenesis[J]. Cells Tissues Organs, 2007, 185(1): 20-28.

(责任编辑:冉明会)

in control group. All rats was sacrificed to get the bladder at the end of 8 w. All bladders were stored in negative 80℃ liquid nitrogen. Ras was detected by immunohistochemistry, and PLC ε mRNA was detected by RT-PCR. *Results*: Tumor appeared in 36 rats out of 50 rats in experimental group. Totally tumor formation rate was 81.82%. While there is no tumor appeared in control group. Ras protein was positive in 32 rats in experimental group by immunohistochemistry, while negative in control group. PCR showed PLC ε mRNA was positive in experimental group, while negative in control group. *Conclusion*: MNU could induce the oncogenesis in bladder. The possible mechanism was MNU make Ras actived and PLC ε overexpressed.

【Key words】MNU; Bladder cancer; Mechanism; H-Ras; PLC ε

1 材料和方法

1.1 动物模型的建立

将 60 只 8 周龄雌性 SD 大鼠随机分为实验组，对照组。实验组 50 只，对照组 10 只。N-甲基-N-亚硝基脲(N-methyl-N-nitrosourea, MNU)用 pH 为 6.0 的 PBS 溶液按照浓度为 10 mg/ml 溶解，溶解后的 MNU 每次在 60 min 内用完。两组动物处理均用 10%水合氯醛按照 1 ml/kg 剂量常规麻醉后仰卧位固定与操作台上，常规消毒后。下腹正中切开腹壁，暴露膀胱，实验组用 MNU(Applichem Germany)灌注，每两周 1 次，连续灌注 4 次，每次 0.2 ml/只。每次灌注后逐层关闭大鼠腹壁。对照组灌注用生理盐水 0.2 ml/次，每 2 周 1 次，共 4 次。第 9 周末处死大鼠。

1.2 免疫组化

免疫组化采用 SP 法，每个蜡块取 4 mm 厚连续切片做免疫组化染色具体染色方法按试剂盒说明书进行。兔抗鼠 Ras 单克隆抗体购自 Santa 有限公司，SP 免疫组化试剂盒和抗体稀释液购自北京中杉公司。

1.3 引物设计

参照在 GenBank 查找大鼠 PLCε 基因序列，利用 primer premier5 和 oligo6 软件自行设计 PLCε 特异引物序列，经 BLAST 检索后由大连宝生物工程有限公司合成。选取 β-肌动蛋白(β-actin)为内参照物。PLCε 上游引物：5'-CAT GGA AGG ATA AGC GTT GGT-3'，下游引物：5'-CCC AAGTCC CGT GTT AAG A-3'，PCR 扩增片段长度为 395 bp；β-actin 上游引物序：5'-GGG ACC TGA CTG ACT ACC TC-3'，下游引物 5'-CGTCAT ACT CCT GCT TGC TG-3'，扩增片断为 543 bp。

1.4 RT-PCR

用 TRIzol 提取组织总 RNA，方法参照产品说明书，取 0.5 μg 总 RNA 用于 RT-PCR，方法参照逆转录 PCR 试剂盒，RT 反应条件为：42℃ 30 min，99℃ 5 min，5℃ 5 min；PCR 反应条件：94℃预变性 2 min，94℃变性 30 s、56℃退火 30 s、72℃延伸 40 s 共 35 个循环，最后 72℃再次延伸 5 min。取 5 μl PCR 产物经 1.5%琼脂糖凝胶(含 EB 0.5 μg/ml)电泳，180 V，电泳10 min，然后在 BIO-RAD 成像仪上成像分析。山羊抗人 PLC ε 多克隆抗体购自 SANTA CRUZ 公司。

1.5 统计学处理

所有数据均采用 SPSS10.5 统计软件进行方差分析和 t 检验，结果用均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示，$P<0.05$ 有显著统计学意义。

2 结 果

2.1 大鼠成瘤情况

MNU 诱导第 3 周，大鼠膀胱壁出现炎性改变。在第 8 周，在试验组 50 只大鼠中 36 只大鼠出现血尿等症状，4 只大鼠在诱导过程中死亡。第 4 周末取膀胱标本，病理显示膀胱出现不典型增生变化。第 9 周处死大鼠取膀胱标本，膀胱切开可见突出于黏膜表面的肿物，病理显示为原位癌(图 1)。成瘤率为 81.82%。对照组大鼠没有出现血尿，体重减轻等症状。膀胱切开仅见部分膀胱壁上有瘢痕组织。

2.2 Ras 蛋白在膀胱癌中呈高表达

免疫组化分析显示实验组 32 只大鼠 Ras 蛋白在胞核内表达呈阳性表达，胞核染为棕色或者棕黄色，阳性表达率为：88.89%。对照组没有大鼠的 Ras 蛋白表达阳性，胞核内未见棕色颗粒，可见胞浆内蓝染颗粒(如图 2 所示)。

2.3 PLCε 在大鼠膀胱癌中呈高表达

RT-PCR 结果显示所有标本在 543 bp 处均出现 β-actin 特异性扩增条带，实验组成瘤大鼠膀胱组织和未成瘤大鼠膀胱组织均在 395 bp 处出现 PLC ε 特异性扩增条带(图 3)。各标本经过凝胶成像系统分析(以特意扩增条带比内参)实验组 PLCε mRNA 表达水平为 0.67 ± 0.08，对照组 PLCε mRNA 表达水平在 0.21 ± 0.05，2 组间差异具有统计学意义($P<0.5$)。

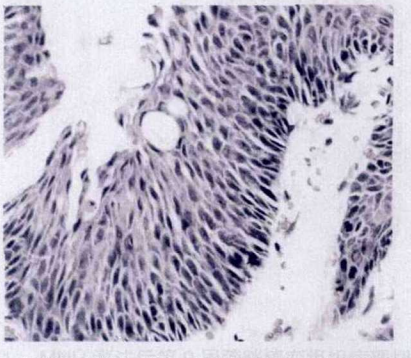
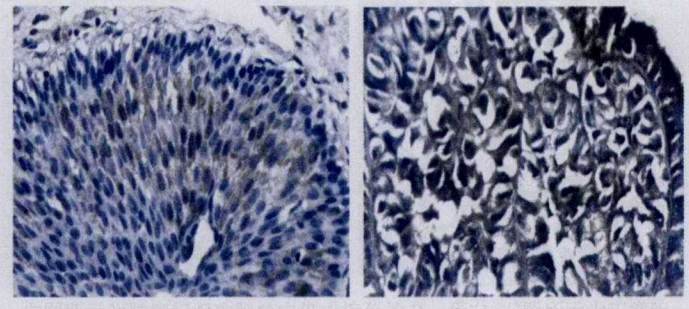
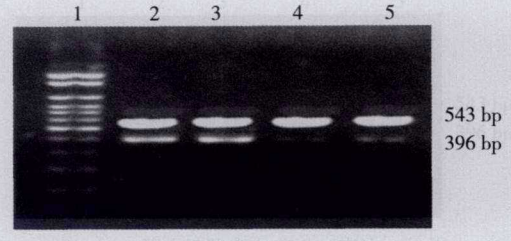


图 1 MNU 灌注后第 9 周膀胱癌变组织病理切片 (HE×200)



左图所示为肿瘤组织中胞核内染成棕色的 Ras 蛋白，右图所示为正常组织未见胞核内黄染的 Ras 蛋白表达(DAB 染色×400)

图 2 免疫组化染色



1. marker；2. 9 周末膀胱癌中 PLC ε 表达；3. 6 周末膀胱组织中 PLC ε 表达；4. Ras 阴性组中 PLC ε 表达；5. 对照组 PLC ε 表达

图 3 PLC ε mRNA 的表达

3 讨 论

MNU 膀胱灌注建立膀胱原位癌模型是由 Hicks 等人在 1980 年首次提出来的，近年来得到极大的推崇。Hicks 提出的 6 mg 的总剂量诱导膀胱癌，诱导周期为 12~20 周[1]。国外另一个学者 Irving 提出用 8 mg 的剂量诱导膀胱癌，诱导周期缩短为 8~12 周[2]。本实验采用 8 mg 的剂量在 8 周末能够明显的看到膀胱黏膜的变化。在成瘤率方面本实验在 8 周末成瘤率为 81.82%，和国内胡宏波等报道的实验结果很相似[3]。

MNU 诱导正常组织发生癌变的机制，国外学者在做MNU 诱导乳腺癌的时候提出 MNU 主要引起 DNA 复制过程中 6-端鸟苷酸甲基化，引起 DNA 复制过程中 G-A 突变。与此同时超过 85%的 NMU 引起的乳腺癌中发现有 H-Ras 基因的 G-A 突变。因此 H-Ras 基因的突变被认为是 NMU 引起乳腺癌的主要机制[4]。与此同时 MNU 还可以引起 DNA 的低甲基化。H-Ras 是膀胱癌最早发现癌基因之一，在 TCCB 中主要通过突变的蛋白产物致癌[5]。H-Ras 突变致瘤机理主要是它编码的细胞膜蛋白是一个鸟嘌呤核苷酸结合蛋白(G 蛋白)，该蛋白保留了 GTP 结合活性，失去了 GTP 水解活性，使 G 蛋白持续激活；而且 G 蛋白可以同多种效应蛋白分子相互作用激活多条下游信号传递通路使有丝分裂信号持续传入，细胞过度增殖而使细胞发生恶性转变。为证实 MNU 诱导大鼠膀胱癌变的可能机制为 H-Ras 突变，本实验中，我们用免疫组化的方法检测 MNU 引起的膀胱癌中的表达。结果显示在实验组 36 只大鼠中 32 只大鼠的 H-Ras 蛋白呈高表达状态。而对照组 10 只大鼠中没有发现 H-Ras 蛋白的阳性表达。显示 MNU 引起 H-Ras 基因的突变可能是 MNU 引起正常膀胱粘膜癌变的主要机制。为进一步阐明 H-Ras 在 MNU 诱导大鼠膀胱癌的重要作用，我们研究了 H-Ras 的下游效应分子 PLCε 在大鼠膀胱癌中的基因表达。

PLC ε 基因是 Song 等在 2001 年发现并分离的磷脂酶 C 家族的新成员[6]。研究表明 PLC ε 是 Ras 家族下游的一个效应分子[7]。PLC ε 能被 H-Ras 的蛋白表达产物激活，因为 PLC ε 不仅具有代表 PLC 典型特征催化结构域(X 和 Y)、C2 结构域同源序列，而且羧基端还有两个特异性的 RA(Ras association，RA)结构域和氨基端 Ras GEF 结构域。PLC ε 可作为Ras 基因过表达的一个分子标志。在本实验中我们用 RT-PCR 技术检测实验动物膀胱的 PLC ε 基因的表达。实验结果显示在膀胱癌组织中 PLC ε 表达明显高于正常对照组，且在 H-Ras 表达阴性的大鼠膀胱癌组织中呈明显低表达。而在对照组各大鼠膀胱组织中 PLC ε 的表达呈明显的低表达或者没有特异性的条带。结果进一步显示 MNU 引起膀胱发生癌变的机制为引起 H-Ras 基因的突变，进而引起下游效应分子 PLC ε 的表达增加。

实验结果显示 MNU 是一种良好的膀胱癌诱导剂。MNU 诱导的膀胱肿瘤组织学形态和病理特征与人膀胱肿瘤十分相似。目前国内还没有类似的关于 MNU 诱导癌变的机制报道。根据我们的实验 MNU 诱导正常膀胱黏膜癌变可能的机制为引起正常膀胱上皮细胞 H-Ras 基因的突变并过表达，同时引起 PLC ε 基因过表达。

参 考 文 献

[1] Hicks R M.Multistage carcinogenesis in the urinary bladder[J].Br Mcd Bull,1980,36(1):39-46.

[2] Irving C C,Cox R,Murphy W M,et al.Influence of dose of N-methyl-N-nitrosourea on the induction of urinary bladder cancer in rats [J].Cancer letter,1979,8(1):3-7.

[3] 胡宏波，罗春丽.膀胱肿瘤动物模型研究进展[J].国外医学临床生物化学与检验学分册，2004，5(5)：426.

[4] Yao R,Wang Y,Lu Y,et al. Efficacy of the farnesyltransferase inhibitor R115777 in a rat mammary tumor model: role of Ha-ras mutations and use of microarray analysis in identifying potential targets[J].Carcinogenesis, 2006,27(7):1420-1431.

[5] 张 睿，张建军，何祖银，等.膀胱癌相关基因的研究进展[J]. 癌症，2003，22(1)：104-107.

[6] Song C,Hu C D,Masago M,et al.Regulation of a novel human phospholipase C:PLC epsilon: through membrane targeting by Ras [J].J Biol Chem,2001,276(4):2752-2757.

[7] Bunney T D,Katan M.Phospholipase C ζ: linking second messengers and small GTPases[J].J.Trends Cell Biol,2006,16(2):640-648.

(责任编辑：关蕴良)